

Aus der Fachgruppe für Mykologie und
bakteriologisch-serologische Diagnostik des
Robert-Koch-Institutes Berlin

Leiter: Prof. Dr. med., Dr. med. vet. F. Staib

DAS CRYPTOCOCCOM UND AMPHOTERICIN B
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Therapie
der Cryptococcose

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Wolfgang Preuß
aus Berlin

Erhard Radlmeier
aus Landshut

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Fachgruppe für Mykologie und
bakteriologisch-serologische Diagnostik des
Robert Koch-Institutes Berlin
Leiter: Prof.Dr.med.,Dr.med.vet. F. Staib

DAS CRYPTOCOCCOM UND AMPHOTERICIN B

Tierexperimentelle Untersuchungen zur Therapie
der Cryptococcose

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Wolfgang Frouß
aus Berlin

Erhard Radlmeier
aus Landshut

Referent: Professor Dr.med.,Dr.med.vet. Friedrich S t a i b
Korreferent: Professor Dr.med. Meta A l e x a n d e r

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin



Promoviert am: 17.Oktober 1975

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
Problemstellung	4
II. Material und Methodik	5
III. Ergebnisse	18
Das Cryptococcum und seine Therapie mit Amphotericin B im Tierversiment	
A. Das unbehandelte Cryptococcum	18
a) Beobachtungen am infizierten Tier	
b) Makroskopische Beurteilung der Organe und mikrobiologischer Erregernachweis im Sektions- material	
c) Histologische Befunde des Sektionsmaterials	
B. Der Einfluß von Amphotericin B auf die Ausbildung des Crypto- coccoma in Muskel und die Streu- ung von <u>Cryptococcus neoformans</u>	28
1. Infektion und gleichzeitiger Beginn der Applikation von Amphotericin B	28
a) Beobachtungen am infizierten Tier	
b) Makroskopische Beurteilung der Organe und mikrobiologischer Erregernachweis in Sektions- material	
c) Histologische Befunde des Sektionsmaterials	

2.	Beginn der Applikation von Amphotericin B 15 Tage nach der Infektion	35
a)	Beobachtungen am infizierten Tier	
b)	Makroskopische Beurteilung der Organe und mikrobiologischer Erregernachweis im Sektions- material	
c)	Histologische Befunde des Sektionsmaterials	
C.	Nicht infizierte und nicht behandelte Kontrolltiere	43
D.	Das Körpergewicht der Tiere während des Versuchs	45
E.	Über die Beurteilung des Crypto- coccos im Hinterschenkel der Maus in vivo	46
F.	Empfindlichkeitsprüfung gegen Amphotericin B in vitro	50
IV.	Diskussion	51
V.	Zusammenfassung	60
VI.	Literaturverzeichnis	I-VII

I. Einleitung

Cryptococcus neoformans ist der Erreger der Cryptococcose, früher auch Torulose oder Europäische Blastomykose genannt, einer meist tödlich verlaufenden und selten rechtzeitig diagnostizierten Mykose mit bevorzugtem Befall des Zentralnervensystems (ZNS) (9, 10, 38).

C. neoformans gilt als hefeähnlicher Pilz und ist gegenwärtig bei der Gattung Cryptococcus in die Familie der Cryptococcaceae eingeordnet. Der vor kurzem erstmals beschriebene Nachweis von Myzelbildung bei einzelnen Stämmen von C. neoformans führte zu der noch ungeklärten Frage, ob möglicherweise die bisher bekannte sprossende Wachstumsform und Vermehrungsweise von C. neoformans nur eine bestimmte Zustandsform dieses Pilzes als Krankheitserreger ist (19).

C. neoformans entwickelt sich auf den gebräuchlichen Nährmedien wie z.B. Nähragar, Blutagar, SABOURAUD-Dextrose-Agar bei Temperaturen bis zu 37°C in Form runder, glattrandiger, cremefarbener Kolonien, deren Konsistenz von pastös bis mukös variieren kann. Die Zellform ist auffallend rund; ihre Größe variiert in vitro zwischen 4-10 µ. Charakteristisch für die C. neoformans-Zelle ist ihre starke Bekapselung in vivo, die als ihr besonderes Pathogenitätskriterium diskutiert wird. Die Identifizierung von C. neoformans wird gegenwärtig mit Hilfe des internationa-

len Differenzierungsschlüssels für Sproßpilze durchgeführt (29). Erst seit Einführung eines Differentialnährbodens war ein verbindliches epidemiologisches Studium über Vorkommen und Verbreitung dieses Pilzes möglich (50, 53, 54, 57).

C. neoformans kommt beim Menschen nicht saprophytär vor wie etwa Candida albicans. Er hat seinen Standort in Vogelfäkalien und auch auf pflanzlichem Material. Durch seine außergewöhnliche Osmotoleranz und Austrocknungsresistenz wird die Aufklärung epidemiologisch-ökologischer Zusammenhänge oft erschwert (41, 47, 50).

Als meist diskutierte Eintrittspforte für C. neoformans beim Menschen gilt gegenwärtig die Lunge (24). Die Streuung und Manifestation in anderen Organen einschließlich Skelettsystem und hauptsächlich ZNS, wird meist bestimmt durch verschiedenste Grundkrankheiten (16, 28, 38).

Pathologisch-anatomisch ist die Cryptococcose charakterisiert durch das sog. Cryptococcom (früher Torulom) (9, 10, 36, 38, 48). Es handelt sich um Haufen sprossender, bekapselter Zellen von C. neoformans bei gleichzeitig fehlender oder armer Gewebsreaktion. Das Cryptococcom imponiert durch seine weiße Farbe, festweiche Konsistenz und meist scharfe Begrenzung gegenüber dem jeweiligen Organgewebe wie ein Tumor. Diese Herdbildung kann unter Verdrängung und Zerstö-

rung des Grundgewebes in den verschiedensten Organen wie Lunge, Knochen, Lymphknoten, Gehirn u.a. zur Ausbildung gelangen (1, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 24, 26, 27, 28, 33, 37, 40, 55, 57, 60, 63, 64, 65). Diese pathologisch-anatomischen Veränderungen, die schon BUSSE bei seiner Erstbeschreibung eindrucksvoll nachweisen und beschreiben konnte, führten kurz darauf zu der treffenden Artbezeichnung "neoformans" (9, 10, 39).

Demzufolge wurde schon mit der Erstbeschreibung dieser Infektionskrankheit das pathologisch-anatomische Kriterium, das doch in therapeutischer Sicht zu interessieren hat, klar erkannt.

Der für die Cryptococcose anfänglich reaktionslose Verlauf, der eine oft späte Erkennung der Erkrankung zur Folge hat (25, 66), führte zwangsläufig zu der Problematik um die Beurteilung eines Chemotherapeutikums. In diesem Zusammenhang ist die Frage des rechtzeitigen Therapiebeginns und der Wirkung bzw. Wirkungslosigkeit des Therapeutikums aufgrund bestimmter pathologisch-anatomischer Veränderungen von Interesse.

Für die Therapie der Cryptococcose stehen nur wenige Präparate zur Verfügung (45). Die bisher umfangreichsten Erfahrungen wurden mit dem Polyen-Antibiotikum Amphotericin B gesammelt (27, 31, 34, 37, 45, 50, 60, 63).

Obwohl C. neoformans für den Menschen als fakultativ-pathogener Erreger gilt, ist es möglich, im Tierexperiment unter Verwendung gesunder Tiere und bevorzugt bei der weißen Maus, verschiedene Infektionsabläufe und pathologisch-anatomische Veränderungen zu erzeugen, die denen beim Menschen weitgehend gleichen. Aufgrund dieser Gegebenheiten wurden verschiedenartige Versuchsanordnungen für die Prüfung von Antimykotika zur Therapie der Cryptococcose herangezogen. Hierbei stand allerdings das Cryptococcom als interessierendes pathologisch-anatomisches Kriterium nie zur Diskussion (12, 19, 35, 42, 43, 45).

Problemstellung

Da es bei der weißen Maus möglich ist, nach i.m.-Injektion bestimmter C. neoformans-Stämme im Injektionsbereich ein verfolgbares Cryptococcom zu erzeugen, bei gleichzeitiger Streuung des Erregers in alle parenchymatösen Organe, stellte sich folgende Frage: Ist C. neoformans in seinem Wachstum bei den für das Cryptococcom charakteristischen pathologisch-anatomischen Veränderungen durch Amphotericin B zu beeinflussen?

II. Material und Methodik

Für vorliegende Prüfung diente der Stamm C. neoformans W 71 (1961 aus Kanarienvogelkot isoliert) (49).

Kultur: 48 Std./26°C auf Antibiotika-freiem SABOURAUD-Dextrose-Agar, aufgeschwemmt in 0,85 %iger NaCl-Lösung, Keimdichte: $2,3 \times 10^7/\text{ml}$. Die intramuskuläre Injektion von 0,2 ml dieser Aufschwemmung wurde am rechten Hinterschenkel durchgeführt (48, 52).

Versuchstiere: 500 weiße, männliche NMRI-Mäuse, bei Versuchsbeginn durchschnittliches Körpergewicht 17 g.

Die Herstellung der Amphotericin B-Suspension erfolgte mit Dimethylsulfoxid (DMSO) nach SHADOMY, S., SHADOMY, H.J. and UTEZ, J.P. (45). Von Ausgangssuspensionen mit 200 mg/ml in 50 % DMSO wurde die Verdünnung von 1 mg Amphotericin B in 5 % DMSO hergestellt. Mit Hilfe der Nagonsonde wurde täglich 1 mg Amphotericin B in 0,05 ml einer 5 %igen DMSO-Lösung verabreicht. Diese Dosis entsprach bei Versuchsbeginn mehr als 50 mg/kg Körpergewicht.

Das Versuchstierkontingent setzte sich aus folgenden 5 Gruppen zu je 100 Tieren zusammen:

Gruppe 1: Intramuskulär infiziert, nicht behandelt.

Ab 2. Tag post injectionem (p.i.) wurden täglich 2 Tiere zum Zweck des mikrobiologischen und patho-histologischen Studiums des *Cryptococcoms* und der Frage der Streuung von C. neoformans getötet.

Gruppe 2: Intramuskulär infiziert, nicht behandelt.

Beobachtung über den gesamten Versuchszeitraum von 90 Tagen. (Therapiekontrolle).

Gruppe 3: Intramuskulär infiziert und ab dem Tag der

Injektion täglich über einen Zeitraum von 30 Tagen oral behandelt.

Gruppe 4: Intramuskulär infiziert.

Therapiebeginn 16 Tage nach der Infektion. Therapiedauer 29 Tage, bei 35 Tieren 52 Tage. Bis zum 15. Tag verstorbene Tiere wurden durch entsprechend infizierte Tiere ersetzt.

Gruppe 5: Nicht infiziert, nicht behandelt.

Die 100 Tiere einer Gruppe waren zu je 10 Tieren in einem Käfig untergebracht. Die Nahrung der Tiere bestand aus Herilan^(R) HAN^(R) MR 3^{*)} und Leitungswasser.

*) Hersteller: Fa. H. Eggersmann KG.,
326 Rinteln/Weser

Äußerlich sichtbare Veränderungen der Tiere wurden beurteilt und die Verdickungen der Hinterschenkel in die folgenden 4 Stadien eingeteilt:

- I. = erste sichtbare Verdickung
- II. = gut erkennbare Verdickung
- III. = massive Verdickung
- IV. = massive Verdickung mit Bewegungseinschränkung.

Für diese Inspektion, wie auch zur regelmäßigen Gewichtskontrolle wurden jeweils die 10 Mäuse eines Kastens beurteilt bzw. gewogen.

Die verendeten oder getöteten Tiere wurden unter weitgehend aseptischen Kautelen seziiert. Hierbei erfolgte zunächst eine makroskopische Beurteilung folgender Organe: infizierter Muskel, Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere und Gehirn.

Von den genannten Organen diente ein Teil der mikrobiologischen und ein Teil der patho-histologischen Untersuchung. Die mikrobiologische Untersuchung erfolgte vorzugsweise mittels des kulturellen Erregernachweises. Dieser wurde erleichtert durch die Verwendung des Differentialnährbodens Guizotia abyssinica-Kreatinin-Agar. Hierbei wurde die Schnittfläche zuvor abgebrannter Organe auf die Nährbodenoberfläche ausgeimpft und anschließend ca. 5 Tage/26°C belassen. Die Beurteilung erfolgte durch den Nachweis von Koloniebildung bei gleichzeitigem Vorliegen des für

C. neoformans spezifischen Braunfarb-effektes (BFE) (53).

Bei Vorliegen auffälliger Organveränderungen wurde auch vom mikroskopischen Direktpräparat (Nativpräparat) Gebrauch gemacht. Hierbei interessierte besonders die Kapselbildung bei der C. neoformans-Zelle (s. Abb. 1).

Für die patho-histologische Untersuchung wurde parallel zur mikrobiologischen Untersuchung Gewebsmaterial vom infizierten Hinterschankel und den Organen Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere in 10 %igem Formalin fixiert. Die Paraffinschnitte wurden nach folgenden Methoden gefärbt: Hämatoxylin-Eosin (H.E.) als orientierende Färbung; Perjod-säure-Schiff-Reaktion (PAS) nach HOTCHKISS und McMANUS zur Pilzdarstellung; Elastica-van-GIESON-Färbung, Trichrom-Färbung nach MASSON-GOLDNER und Versilberung nach GOMORI wurden zur Bindegewebs- bzw. Faserdarstellung durchgeführt.

Für die patho-histologischen Untersuchungen fanden Tiere der Gruppen 1, 3 und 4 Verwendung. Von der Gruppe 1 wurden insgesamt 48 Tiere untersucht, wobei vom 2. - 23. Tag p.i. täglich 2 Tiere getötet wurden und dann je 1 Tier am 25. und 28. Tag. Bei den Gruppen 3 und 4 erfolgte eine patho-histologische Untersuchung nur bei je 10 Tieren. Die von der Gruppe 4 untersuchten 10 Tiere wurden 15 Tage p.i. über einen Zeitraum von 52 Tagen behandelt.

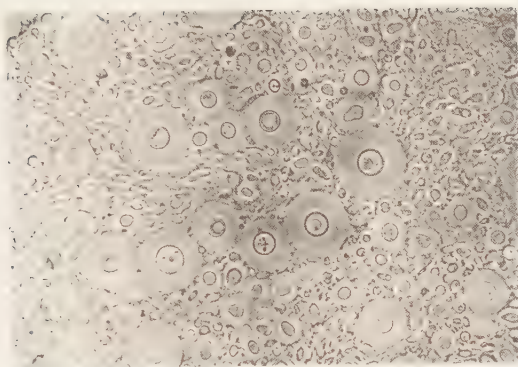


Abbildung 1

Blutausstrich Zellen von C. neoformans

Nativpräparat aus einem 4 Wochen alten Cryptococcum von
einem unbehandelten Tier der Gruppe 1.

(x 500).

Herstellung der Nährböden

Guizotia abyssinica-Kreatinin-Agar:

50 g Samen der Komposite Guizotia abyssinica (Negersaat) werden mit einem elektrischen Mixer fein zerkleinert und 1000 ml Aqua dest. zugegeben; das Ganze wird 30 Min. gekocht, dann durch ein Papierfilter filtriert und das Filtrat mit Aqua dest. auf eine Endmenge von 1000 ml aufgefüllt. Zu diesem Filtrat (1000 ml) werden folgende Substanzen zugesetzt:

Dextrose 10 g; KH_2PO_4 1 g; Kreatinin 1 g; Agar 15 g.

Das Ganze wird anschließend 25 Min./110°C belassen und danach in Petrischalen gegossen. Der erstarrte Nährboden ist farblos. Der pH-Wert dieses so hergestellten Substrats soll ca. 5,5 betragen. Je nach Bedarf können Bakterien- und Schimmelpilz-hemmende Substanzen ohne störenden Einfluß auf den BFE zugesetzt werden. Nach Abkühlen des Nährbodens auf ca. 50°C werden z.B. Streptomycinsulfat (40 E/ml) und Penicillin G (20 E/ml) zugesetzt. Zur Wachstumshemmung störender Schimmelpilze bewährte sich Diphenyl in einer Konzentration von 0,1 %. 1 g Diphenyl in 20 ml absolutem Alkohol werden 1000 ml Nährboden zugesetzt, gut gemischt und anschließend in Petrischalen gegossen (54).

SABOURAUD-Dextrose-Agar:

Aqua dest. 1000 ml; Dextrose 40 g; Bacto-Pepton (Difco) 10 g; Agar 15 g. 20 Min. Dampftopf, anschließend 15 Min./110°C. Das Ganze wird in Petrischalen gegossen.

Amphotericin B^{*)}

Amphotericin B wird aus Kulturfiltrat von Streptomyces nodosus gewonnen (21, 62). Es ist ein amphoterer Heptaen und enthält eine Desoxyaminohexose. Die Summenformel lautet wahrscheinlich: $C_{46}H_{73}O_{20}H$. Amphotericin B ist ein gelbes Pulver, das in Wasser bei pH 6 - 7 unlöslich ist und als schwache Base reagiert. Die Wasserlöslichkeit wird durch Desoxycholatnatrium gesteigert. Eine noch bessere Löslichkeit wird in organischen Lösungsmitteln wie z.B. Dimethylsulfoxyd (DMSO) erreicht. Als Handelsform ist ein Amphotericin B-Natrium-desoxycholat-Komplex + Phosphatpuffer erhältlich. Der genaue Wirkungsmechanismus von Amphotericin B steht noch nicht fest. Die Zellschädigung wird in einer Einwirkung auf die Zytoplasmamembran gesehen (62).

Wegen der schweren Wasserlöslichkeit und ungenügenden Resorption durch die Darmwand des Menschen kann ein ausreichender Blutspiegel nur bei Dauertropfinfusion des Präpa-

*) Hersteller: Fa. SQUIBB, USA. Vertrieb in der Bundesrepublik Deutschland und West-Berlin: Chemische Fabrik VON HEYDEN GmbH., München.

rates erreicht werden. Oral verabreicht soll Amphotericin B erst in Dosen von 100 mg/kg Körpergewicht der i.v.-Gabe vergleichbare Serumwerte erreichen. Die Dosis bei der Infusionstherapie liegt zwischen 0,7 - 1,5 mg/kg Körpergewicht (3, 62). Wegen der Möglichkeit verschiedenartiger Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Schüttelfrost, Krämpfe, Anämien und Nierenschädigungen kann eine Amphotericin B-Therapie nur unter klinischer Überwachung durchgeführt werden (4, 8, 11, 13, 58, 59).

Da die Darmwand der Maus im Gegensatz zu der des Menschen eine ausreichende Resorption und damit wirksame Blutspiegel von Amphotericin B zuläßt, wird bei tierexperimentellen Untersuchungen über dieses Präparat von der oralen Verabreichung Gebrauch gemacht (12, 35, 44).

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß in dieser Arbeit dem Tierversuchsmodell das Hauptaugenmerk geschenkt werden sollte. Unsere Befunde sollten mit den jüngsten umfangreichen Ergebnissen von SHADOMY et al. (45) verglichen werden. Da hierbei DMSO als Trägersubstanz und Resorptionsvermittler diente, wurde auch bei vorliegender Prüfung DMSO verwandt.

Empfindlichkeitsprüfung gegenüber Amphotericin B in vitro

Um die Empfindlichkeit von C. neoformans gegenüber Amphotericin B in vitro zu untersuchen, impften wir Proben der interessierenden Organe auf SABOURAUD-Dextrose-Agar aus, der Amphotericin B in folgenden Konzentrationen enthielt: 50; 10; 1; 0,1 und 0,05 γ /ml. Als Kontrolle diente *Guizotia abyssinica*-Kreatinin-Agar ohne Amphotericin B. Diese Empfindlichkeitsprüfung erfolgte mit Tieren der Gruppe 4, die 29 Tage lang mit Amphotericin B behandelt wurden und mit Tieren der Gruppe 2, die infiziert, aber unbehandelt blieben (s. Abb. 2a, b und c).

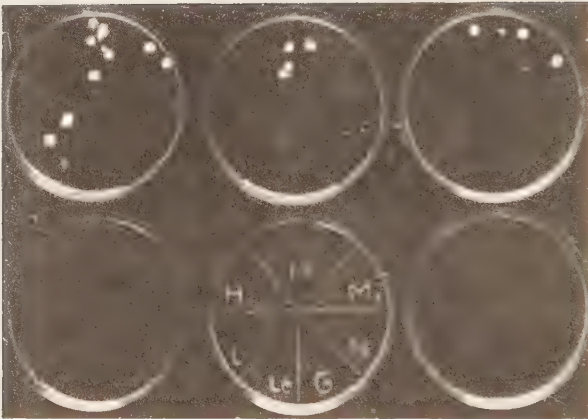


Abbildung 2a

Empfindlichkeitsprüfung gegenüber Amphotericin B in vitro

Proben der untersuchten Organe bei einem Tier der Gruppe 4 nach 29-tägiger Therapie.

Ab einer Konzentration von 1 γ /ml zeigte sich eine vollständige Wachstumshemmung von C. neoformans.

Zeichenerklärung:

Die SABOURAUD-Dextrose-Agar-Platten enthielten Amphotericin B in folgenden Konzentrationen (γ /ml):

	0	0,05	0,1	
	1	10	50	
M	=	Injektionsort (Muskel)	Le	= Leber
Mi	=	Milz	L	= Lunge
N	=	Niere	H	= Herz
G	=	Gehirn		

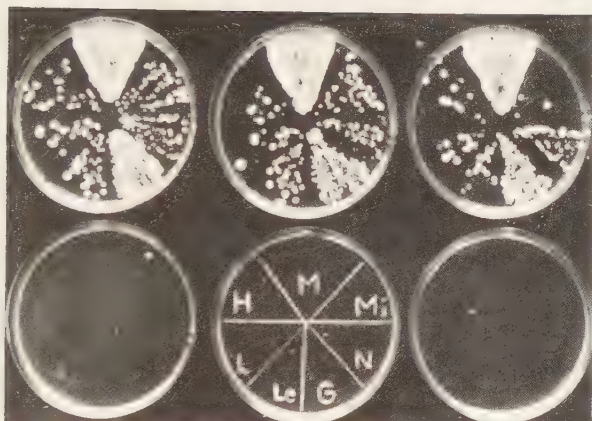


Abbildung 2b

Empfindlichkeitsprüfung gegenüber Amphotericin B in vitro

Proben der untersuchten Organe bei einem unbehandelten Tier der Gruppe 2 (46 Tage p.i.).

Ab einer Konzentration von 1 γ /ml zeigte sich eine vollständige Wachstumshemmung von C. neoformans.

Zeichenerklärung siehe Abbildung 2a

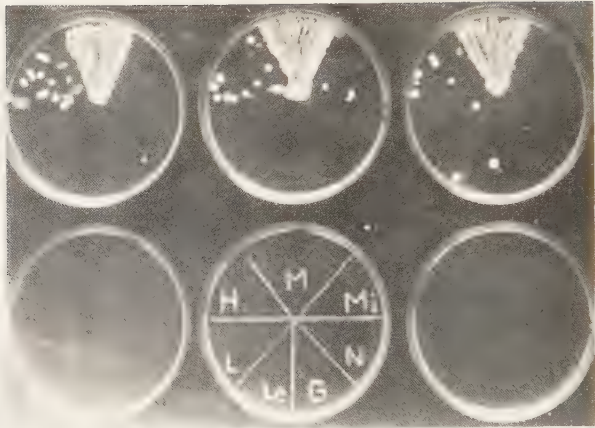


Abbildung 2c

Empfindlichkeitsprüfung gegenüber Amphotericin B in vitro

Proben der untersuchten Organe bei einem unbehandelten Tier der Gruppe 2 (46 Tage p.i.).

Ab einer Konzentration von 1 γ /ml zeigte sich eine vollständige Wachstumshemmung von C. neoformans.

Zeichenerklärung siehe Abbildung 2a

Herstellung von SABOURAUD-Dextrose-Agar-Platten mit verschiedenen Amphotericin B-Konzentrationen:

Herstellung der Amphotericin B-Verdünnung: der Ampulleninhalt (50 mg; Charge 2 D 609 Apr. 1974) wurde in 10 ml Aqua dest. aufgeschwemmt. Von dieser Suspension wurden die Konzentrationen von 500; 100; 10; 1 und 0,5 γ /ml hergestellt und hiervon in Petrischalen pipettiert. Vom flüssigen und auf 50°C abgekühlten SABOURAUD-Dextrose-Agar wurden 9 Teile zugesetzt und das Ganze sorgfältig gemischt.

Zur Kontrolle des Medikaments und seiner Verdünnung wurde der in seiner Empfindlichkeit gegen Amphotericin B bekannte Stamm Candida albicans CBS 2730 mitgeführt (Minimale Hemmkonzentration (MHK) zwischen 0,2 und 0,4 γ /ml). Für diese Kontrolle dienten Platten mit folgenden Konzentrationen: 0,5 und 0,1 γ /ml. Die Beimpfung erfolgte mit 0,01 ml einer Suspension von C. albicans CBS 2730 (Keimdichte ca. 4×10^5 ml). Nach 5 Tagen/26°C fand sich bei einer Konzentration von 0,5 γ /ml keine Koloniebildung. Bei einer Konzentration von 0,1 γ /ml lag im Vergleich zum Kontrollnährboden ein sog. Kümmerwachstum vor. Aufgrund dieser Beobachtung schien diese Methode zur Prüfung unserer Fragestellung als geeignet.

III. Ergebnisse

DAS CRYPTOCOCCOM UND SEINE THERAPIE MIT AMPHOTERICIN B IM TIEREXPERIMENT

A. Das unbehandelte Cryptococcom (Gruppe 1 und 2) =====

a) Beobachtungen am infizierten Tier:

Die infizierten und unbehandelten Tiere waren bis um den 10. Tag unauffällig, d.h. Verhalten und Haarkleid unterschieden sich nicht von denen der Kontrolltiere. Ab dem 10. Tag post injectionem erschien das Haarkleid zunehmend struppig, ungepflegt und gelblich verfärbt. Die Tiere blieben mit ihrem Körpergewicht auch unter der Gewichtszunahme der Kontrolltiere, obwohl gleichzeitig eine ständige Verdickung im Injektionsbereich zu beobachten war.

Da der Vorteil dieses Tierversuchsmodells in einer makroskopisch verfolgbaren Veränderung des Injektionsortes lag, sollte auch dieses als ein Kriterium zur Beurteilung des Infektionsablaufes und der Amphotericin B-Wirkung dienen (s. Abb. 3 und 4).

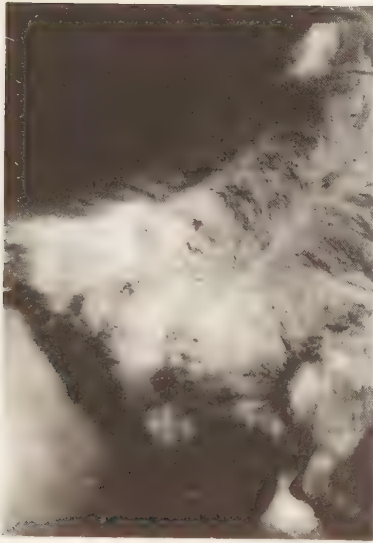


Abbildung 3

Makroskopisch sichtbare Verdickung des Hinterschenkels
bei einem unbehandelten Tier der Gruppe 2, 67 Tage nach
i.m.-Injektion von C. neoformans

Die abgehütete Extremität dieses Tieres ist in Abb. 4 dargestellt.

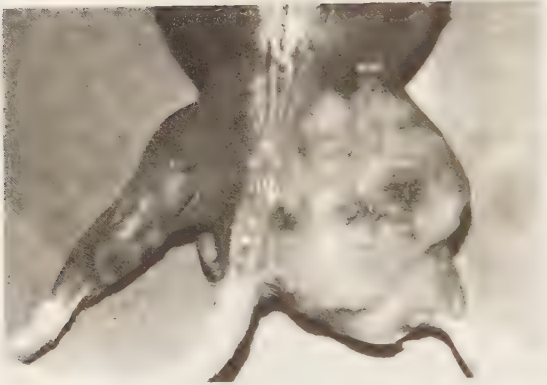


Abbildung 4

Cryptococcombildung im rechten Hinterschenkel der Maus
bei einem unbehandelten Tier der Gruppe 2

Am 67. Tag p.i. wurde die Maus getötet. Sämtliche untersuchten Organe zeigten Befall von C. neoformans.

Vergleiche auch Abb. 3.

b) Makroskopische Beurteilung der Organe und mikrobiologischer Erregernachweis im Sektionsmaterial:

Am 7. Tag p.i. wurde bei den getöteten Tieren das erste sichtbare Cryptococcom mit einem Durchmesser von ca. 2 mm festgestellt. Das Cryptococcom war gegen das rötlich gefärbte Muskelgewebe durch seine porzellanweiße Farbe scharf abgrenzbar und von festweicher Konsistenz, d.h. nicht zerfließlich wie bei einem abszedierenden Prozeß.

Ab dem 13. Tag fanden sich im Hinterschenkel aller untersuchten Tiere ein oder mehrere Cryptococcome mit einem Durchmesser von 3 - 4 mm. Die Cryptococcome waren um den 25. Tag p.i. bis haselnußgroß.

Wie in Tab. 1 zusammenfassend dargestellt, folgte ein zusätzlicher Befall aller untersuchter parenchymatöser Organe. Diese Streuung wurde erstmals am 6. Tag p.i. festgestellt.

Zeichenerklärung für die folgenden Tabellen 1 - 4:

- + = ca. 1 - 5 Kolonien
- ++ = ca. 6 - 20 Kolonien
- +++ = aufgelockerter Kolonierasen
- ++++ = dichter Kolonierasen

Tabelle 1

Kultureller Erregernachweis im Sektionsmaterial von Tieren
der Gruppe 1
 (infizierte und unbehandelte Tiere)

Nr.	Tag	Muskel	Herz	Lunge	Leber	Gehirn	Niere	Milz
1	2.	++++	+		+++		+	+
2	2.	++++		+	+			++
3	3.	++++						
4	3.						+	
5	4.	++++		+	+		+	
6	4.	++++		++	+++	+	++	++
7	5.	+++			+			
8	5.				+	+		
9	6.	++++	+	++	+	+		++
10	6.	+++	+	++	++	+	+	+
11	7.	+++			++			
12	7.	++++						
13	8.	++++				++	++	
14	8.	+++			+++	++	+	+++
15	9.	++++	++	+++	+++	+	+	++
16	9.	++++	++	+++	++	+	+	+++
17	10.	++++	++		+			
18	10.	++++		+	+++	++	+	+++
19	11.	++++	+	+++	+	++	+	+++
20	11.	++++	+++	+++	+++		+	+
21	12.	++++	++	++	++	+	+	
22	12.	++++						
23	13.	++++	+++	++++	+++	+++	+++	+++
24	13.	++++	+	+				+
25	14.	++++	++		+++	+++	+++	+++
26	14.	++++			+		+++	+
27	15.	++++	+	++++	+++	++	+	+++
28	15.	++	++++	+++	+	+	++	+++
29	16.	+						
30	16.	++++		+		++		+
31	17.	++++		+++	+	+		
32	17.	++++	++	+++	+++	+++	+++	+++
33	18.	+++	+	++	+			+
34	18.	++++	++	++	++	++		++
35	19.	+++	++	++++	+++	+++	+++	+++
36	19.	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
37	20.	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++
38	20.	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++
39	21.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
40	21.	+++	+	++	++	++	++	++
41	22.	+++	++	+++	++	++	++	+++
42	22.	+++	++	++	++	++	++	+++
43	23.	+++	++	++	++	++	++	+++
44	24.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
45	24.	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
46	25.	+++	+	+++	+++	++	+++	+++
47	26.	+++	+	+	+++	+++	+++	+++
48	26.	+++	++	+++	+++	++	+++	+++

Die makroskopische Veränderung der Organe war insgesamt einheitlich. Die verendeten Tiere zeigten eine stark vergrößerte Lunge mit auffällig fester Konsistenz. Die Organe Leber, Niere, Milz, Mesenteriallymphknoten und Gehirn wiesen keine makroskopisch erkennbaren Herdbildungen auf, waren aber insgesamt vergrößert.

Die mikroskopische Untersuchung der Organe mit Hilfe des Nativpräparates ergab ein Vorliegen stark bekapselter Zellen von G. neoformans (Durchmesser bis ca. 30 μ) (s. Abb. 1).

Der kulturelle Erregernachweis gelang aus sämtlichen makroskopisch veränderten Organen (s. Tab. 1).

Von der 2. Tiergruppe verendeten bis zum 30. Tag p.i. 50 und bis zum 40. Tag p.i. 70 von insgesamt 100 Tieren (s. Abb. 5).

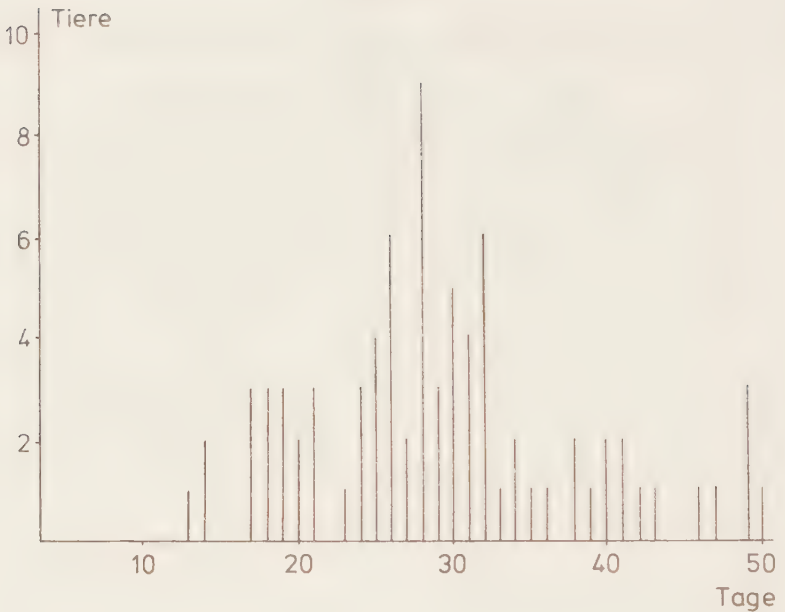


Abbildung 5

Zusammenfassende Darstellung über das Verenden der Mäuse
nach i.m.-Injektion mit dem C. neoformans-Stamm W 71
(Gruppe 2)

Bis zum 30. Tag p.i. verstarben 50 und bis zum 40. Tag
70 der 100 Tiere.

Am 96. Versuchstag lebten noch 2 von 100 Tieren.

c) Histologische Befunde des Sektionsmaterials:

An der Injektionsstelle im Hinterschenkel lagen C. neoformans-Zellen zunächst in der morphologischen Zustandsform vor, wie sie injiziert wurden, d.h. als kapsellose Zellen. Am 4. Tag p.i. zeigte sich hier ein dichtes Infiltrat aus Granulozyten, wenigen Rundzellen und Histiozyten. In den folgenden Tagen fanden sich neben reaktionsreicheren Arealen der granulomatösen Läsion die für die Cryptococcose charakteristische gelatinöse Läsion mit Massen bekapselter C. neoformans-Zellen bei auffallend geringer entzündlicher Reaktion im Gewebe des Hinterschenkels. Die Muskelfasern wurden druckatrophisch, ebenso das Fettgewebe. Erhalten blieb ein gefäßhaltiges Fasergerüst, in dem die Pilzzellen lagen (s. Abb. 6). Die Größenzunahme der infizierten Hinterschenkel ließ sich durch massive Vermehrung stark bekapselter C. neoformans-Zellen erklären.

In den parenchymatösen Organen fanden sich ab 19. Tag p.i. ausgedehnte Infiltrationen und Streuherde mit bekapselten Pilzzellen. Die Lungen enthielten massenhaft C. neoformans meist in diffuser Verteilung. In den Nieren, im Myokard und im Gehirn zeigten sich Erregerabsiedelungen bei nur minimaler Reaktion (s. Abb. 7), in Leber und Milz z.T. eine etwas deutlichere Reaktion reticulo-histiozytärer Zellen und einiger Granulozyten.

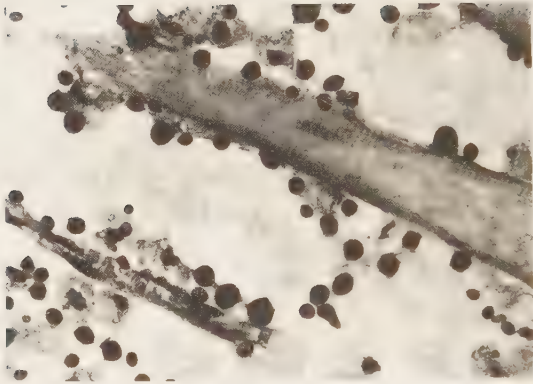


Abbildung 6

Cryptococcom im Hinterschenkel der Maus 22 Tage nach
i.m.-Injektion von C. neoformans bei einem Tier der
Gruppe 1

Massen bekapselter Zellen von C. neoformans im reticulo-
histiozytären Grundgerüst. Einzelne Reste quergestreifter
Muskelfasern. Erythrozytenhaltiges Blutgefäß links unten.
(PAS-Eosin; x 560 Öl)

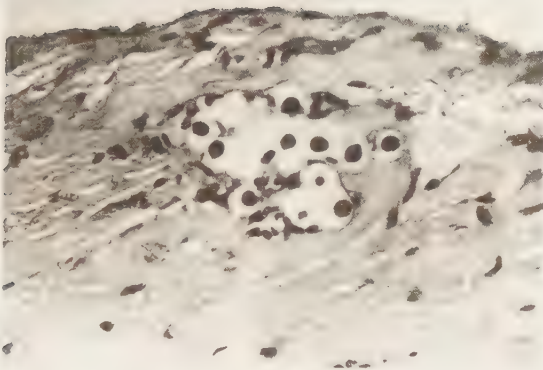


Abbildung 7

Streuerde im Myokard 22 Tage nach i.m.-Injektion von
C. neoformans bei einem unbehandelten Tier der Gruppe 1

Bekapselte Pilzzellen links neben einem venösen Blutgefäß;
weitgehend reaktionslos.

(PAS; x 560 Öl)

B. Der Einfluß von Amphotericin B auf die Ausbildung
=====
des Cryptococcums im Muskel und die Streuung von
=====
C. neoformans
=====

1. Infektion und gleichzeitiger Beginn der Applikation
von Amphotericin B (Gruppe 3)

a) Beobachtungen am infizierten Tier:

Sämtliche so behandelten Tiere blieben über den gesamten Versuchszeitraum unauffällig. Bei keinem der Tiere kam ein Cryptococcum zur Ausbildung.

b) Makroskopische Beurteilung der Organe und mikrobiologischer Erregernachweis im Sektionsmaterial:

Bei sämtlichen getöteten und seziierten Tieren waren die interessierenden Organe einschließlich des infizierten Muskelbereichs makroskopisch unauffällig. Nach 30-tägiger Therapie konnte noch bei 28 % dieser Tiere aus dem makroskopisch unauffälligen Injektionsbereich C. neoformans isoliert werden. Nur bei 5 von 100 Tieren gelang die Isolierung des Erregers außerhalb des Injektionsbereichs und zwar 2mal aus dem Herz und 4mal aus der Milz (s. Abb. 8 und 9).

Diese gesamten Befunde sind in Tab. 2 zusammengefaßt dargestellt.

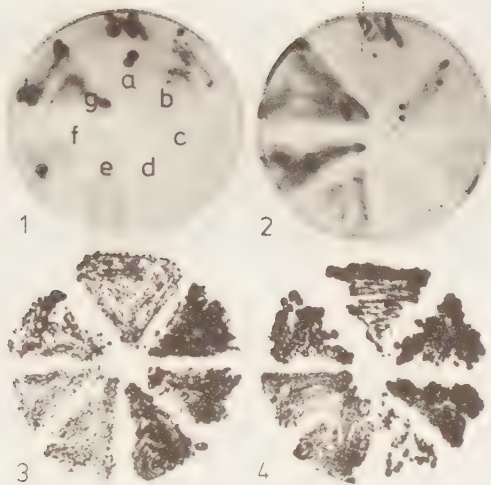


Abbildung 8

Nachweis von *C. neoformans* im Sektionsgut behandelter
(Nr. 1 und 2) und unbehandelter Tiere (Nr. 3 und 4) der
Gruppen 1 bzw. 3 auf Guizotia abyssinica-Kreatinin-Agar
nach 6 Tagen/26°C

Tier Nr. 1 und 2 wurde ab dem Tag der Infektion 30 Tage lang behandelt. Die unbehandelten Tiere Nr. 3 und 4 wurden 28 Tage p.i. getötet.

Auf den Sektoren a - g wurde Material folgender Organe ausgeimpft: a = Injektionsort (Muskel); b = Milz;
c = Niere; d = Gehirn; e = Leber; f = Lunge; g = Herz.

Der Nachweis von *C. neoformans* wurde durch die Dunkelverfärbung der Kolonien auf Guizotia abyssinica-Kreatinin-Agar erleichtert. (Braunfärbefekt, BFE). Grau imitierenden Sektoren sind durch blutiges Sektionsmaterial verursacht.

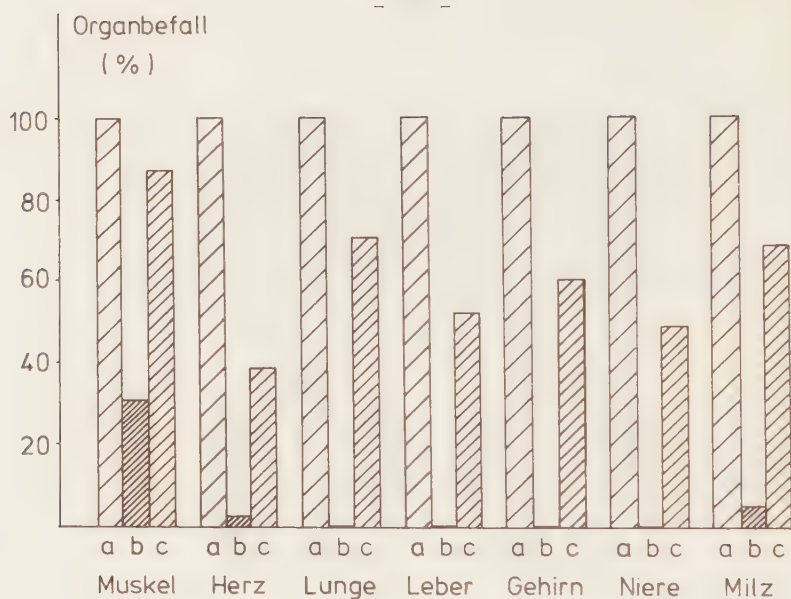


Abb. 1.

Organbefall bei Mäusen, die am 1. Tag nach der Infektion mit *Salmonella typhimurium* (S. typhimurium) infiziert wurden. (Die Zahlen in der Klammer geben die Anzahl der Tiere an, die in der jeweiligen Gruppe untersucht wurden.)

- a : Kontrollgruppe (nicht infiziert),
b : Infektionsgruppe (1. Tag nach Infektion),
c : Infektionsgruppe (ab 1. Tag nach Infektion)

Tabelle 2a

Kultureller Erregernachweis im Sektionsmaterial von Tieren
der Gruppe 3

(ab dem Tag der Injektion 30 Tage lang behandelte Tiere)

Nr.	Tag	Muskel	Herz	Lunge	Leber	Gehirn	Niere	Milz
1	31.							
2	"	+						
3	"							
4	"							
5	"							
6	"							
7	"	+						
8	"							
9	"							
10	"	+						
11	"							
12	"							
13	"	+						
14	"							
15	"	+						
16	"							
17	"							
18	"	+						
19	"							
20	"							
21	"							
22	"							
23	"							
24	"	+						
25	"							
26	"							
27	"							
28	"							
29	"							
30	"							
31	"							
32	"	+						
33	"							
34	"							
35	"							
36	"	+						
37	"	+						
38	"							
39	"							
40	"	+						
41	"	+						
42	"		+					+
43	"							+
44	"	+						
45	"							
46	"	+						
47	"							
48	"							
49	"							
50	"							

Tabelle 2b

Kultureller Erregernachweis im Sektionsmaterial von Tieren
der Gruppe 3

(ab dem Tag der Injektion 30 Tage lang behandelte Tiere)

Nr.	Tag	Muskel	Herz	Lunge	Leber	Gehirn	Niere	Milz
51	31.							
52	"							
53	"							
54	"							
55	"							
56	"							
57	"	+						
58	"							
59	"							
60	"	+						
61	"	+						
62	"	+						
63	"							
64	"							+
65	"	+						
66	"							
67	"	++						
68	"							
69	"							
70	"							
71	"							
72	"							
73	"							
74	"							
75	"	+						
76	"							
77	"							
78	"	+						
79	"	+						
80	"							
81	"							
82	"							
83	"	+	+					
84	"	+						
85	"							
86	"							
87	"							
88	"							
89	"							
90	"	+						
91	"							
92	"							
93	"							
94	"							
95	"							
96	"	+						+
97	"							
98	"							
99	"	+						
100	"							

c) Histologische Befunde des Sektionsmaterials:

Mikroskopisch fanden sich im Injektionsort regelmäßig wenige, vorwiegend unbekapselte Pilzzellen, dabei kaum Gewebsreaktion (s. Abb. 10). In Übereinstimmung mit den mikrobiologischen Befunden ließen sich weder makroskopisch noch mikroskopisch Streuherde in den inneren Organen nachweisen.

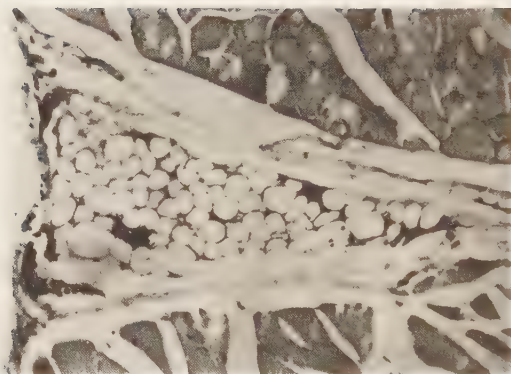


Abbildung 10

Hinterschenkel der Maus 30 Tage nach i.m.-Injektion von
C. neoformans bei einem Tier der Gruppe 3

Beginn der Therapie ab dem Tag der Infektion.

Kleine Konglomerate meist unbekapselter Zellen von
C. neoformans in Fett-Bindegewebe und Muskulatur ohne wesentliche Reaktion. C. neoformans-Zellen sind tiefschwarz dargestellt.

(PAS; x 140)

2. Beginn der Applikation von Amphotericin B 15 Tage
nach der Infektion (Gruppe 4)

a) Beobachtungen am infizierten Tier:

Die Tiere dieser Gruppe entwickelten sich unauffällig bis zum 10. Tag p.i. wie die Tiere der Gruppe 1 und 2. Danach traten zunehmend dieselben Krankheitszeichen wie bei diesen Gruppen auf. Bis zum Therapiebeginn am 16. Tag p.i. verendeten 6 von 100 Tieren. Während der anschließend durchgeführten Therapie über 29 Tage verendete kein weiteres Tier.

Von 35 Tieren, die über einen Zeitraum von 52 Tagen behandelt wurden, verendete während des Behandlungszeitraumes ebenfalls kein Tier.

Zur Beurteilung des Therapieeffektes dieser 29-tägigen Therapiedauer wurden 30 Tiere über einen Zeitraum von 50 Tagen nach Beendigung der Therapie beobachtet. Während dieser Zeit verendeten 24 von 30 Mäusen. Aus allen untersuchten Organen dieser gestorbenen Tiere ließ sich massenhaft vermehrungsfähiger C. neoformans anzüchten (s. Abb. 11).

Über die auch bei dieser Gruppe laufend durchgeführten Untersuchungen über die Cryptococcumbildung, ihre Beeinflussung und das Körpergewicht der Tiere wird zusammenfassend unter D und E berichtet.

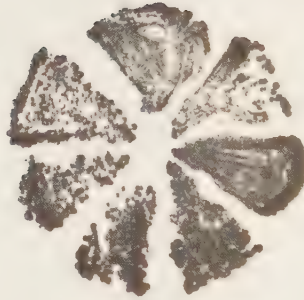


Abbildung 11

Nachweis von vermehrungsfähigem *C. neoformans* auf *Guizotia abyssinica*-Kreatinin-Agar nach 6 Tagen/26°C bei einem Tier der Gruppe 4

Das Tier wurde ab dem 16. Tag p.i. 29 Tage lang behandelt und verstarb 20 Tage nach Therapiebeendigung. Alle untersuchten Organe (Muskel, Milz, Niere, Gehirn, Leber, Lunge und Herz) zeigten starkes Wachstum von *C. neoformans*.

b) makroskopische Beurteilung der Organe und mikrobiologischer Erregernachweis im Sektionsmaterial:

83 % der Tiere, die 29 Tage lang behandelt wurden, zeigten bei der Sektion ein oder mehrere Cryptococcome von 2 - 10 mm Durchmesser. Der kulturelle Erregernachweis gelang bei 87 % der Tiere im Injektionsbereich. Gleichzeitig fand sich bei 57 % der Tiere ein Befall parenchymatöser Organe mit C. neoformans (s. Tab. 3).

Auch bei den Tieren, die 52 Tage lang behandelt wurden, konnte noch in 94 % C. neoformans aus dem Injektionsbereich isoliert werden. Bei diesen Tieren lag in 52 % ein gleichzeitiger Befall parenchymatöser Organe vor (s. Tab. 4).

Tabelle 3

Kultureller Erregernachweis im Sektionsmaterial von Tieren
der Gruppe 4

(infizierte und ab dem 16. Tag 29 Tage lang behandelte Tiere)

Nr.	Tag	Muskel	Herz	Lunge	Leber	Gehirn	Niere	Milz
1	45.	+++	+	+	+	+++	+	+++
2	"	+++		+				+
3	"	+++	+	+	+	+	+	++
4	"	+						
5	"	+++		+			+	+
6	"	+++	+	+++	++	+	+	++
7	"	++						
8	"	+++		+		+		
9	"	+++		++	+			+
10	"	+++	+	+++	+	++	+	++
11	"	+++		++	+	+++	+	+++
12	"	+++				+		+
13	"	++++	+	+	+	++	+	+
14	"							
15	"	++++		++	+	++		+
16	"	++++	+	+	+	+	+	+
17	"	+++						+
18	"	+++		+	+	+++	+	++
19	"	++++		+			+	
20	"	+++		++				+
21	"	++++	++	++	+++	+++	+	+++
22	"	++++	+	+++	++	++	++	++
23	"							
24	"	++++	+	++++	++	+++	++	+++
25	"	++++				+		++
26	"			+				
27	"	+++						
28	"							
29	"	+++	+	+++		+	+	
30	"	+++		++	+	+++		+++

Tabelle 4

Kultureller Erregernachweis im Sektionsmaterial von Tieren
der Gruppe 4

(infizierte und ab dem 16.Tag 52 Tage lang behandelte Tiere)

Nr.	Tag	Muskel	Herz	Lunge	Leber	Gehirn	Niere	Milz
1	67.	++++			+	++		+
2	"	++++		+++	+++	++	+	++
3	"	+						
4	"	++++	+	+	+	+		+
5	"	+++	+	++	++	++	+	++
6	"							
7	"	++++	+	+	+	+		+
8	"	++++	++	++	++	++++	+	+++
9	"	+						
10	"	++++		+++			+	++
11	"	+++		++	++	+		
12	"	++		+				+
13	"	++++		++	+			
14	"	+++	+	+	++	+		
15	"	+++	+	++	+	+	+	+++
16	"	++	+					
17	"	++++		+				
18	"	+++		+				+
19	"	++++	+	++	+	++	+	+
20	"	+++			+		+	
21	"	++++	+	+	+	+		
22	"							
23	"	++++	+	+++	+			+
24	"	+++	+	+++	+++	+++		+++
25	"	++++	+	+	++			++
26	"	++++			+	++	+	+++
27	"	++++		+		+	+	+
28	"	++++	++	+		++		++
29	"	+++	+	+++	+	++	+	++
30	"							
31	"	+++		+	+	++		
32	"	++++						
33	"	+++	+	+			+	
34	"	++++		++		++		+
35	"	+++		+		+++	+	++

c) Histologische Befunde des Sektionsmaterials:

Die unter der Therapie geschrumpften Cryptococcome zeigten im Injektionsgebiet reaktionsarme Areale in Muskulatur und Fettbindegewebe, deren dichtliegende Erregermassen einen auffälligen Kapselschwund boten. In nicht komplett zusammengesinterten Teilen waren kleine erythrozytenhaltige Blutgefäße zu erkennen bei geringer perivaskulärer Rundzellinfiltration und starkem Kapselmangel in der Gefäßumgebung (s. Abb.12).

Daneben traten ausgedehnte Reaktionserscheinungen mit einem unspezifischen, fibrohistiozytären Granulati-
onsgewebe auf. Bekapselte Erregerzellen waren hier nur in geringer Zahl anzutreffen; in völlig bindege-
webig abgekapselten Cryptococcomen dagegen fanden sich auch größere Massen stark bekapselter C. neoformans-Zellen ohne sichtbare Degenerationserscheinungen (s. Abb. 13).

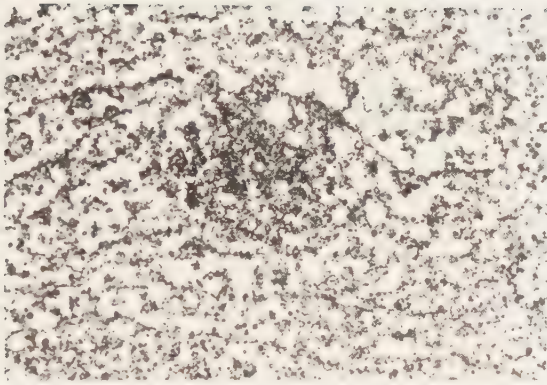


Abbildung 12

Cryptococcom im Hinterschenkel der Maus 67 Tage nach
i.m.-Injektion von C. neoformans bei einem Tier der
Gruppe 4

Beginn der Therapie am 16. Tag p.i.

Perivaskulär stärkerer Kapselmangel im unvollständig zusam-
mengesinterten Cryptococcom. Im Zentrum ein kleines Blut-
gefäß umgeben von dicht liegenden unbekapselten Zellen von
C. neoformans.

(PAS; x 140)

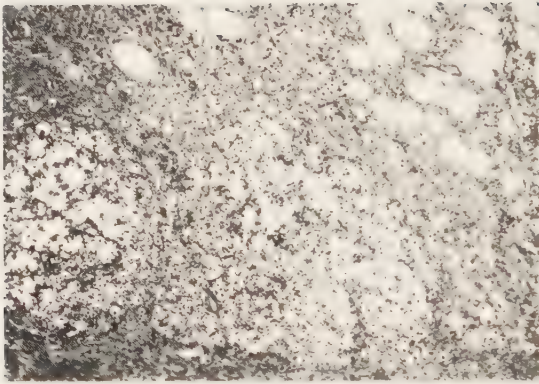


Abbildung 13

Cryptococcom im Hinterschenkel der Maus 67 Tage nach
i.m.-Injektion von C. neoformans bei einem Tier der
Gruppe 4

Beginn der Therapie am 16. Tag p.i.

Durch Granulationsgewebe abgeschirmter Herd dicht liegen-
der bekapselter Zellen von C. neoformans.

Muskelfasern im Querschnitt rechts oben.

(PAS; x 88)

C. Nicht infiziert und nicht behandelte Kontrolltiere
=====

(Gruppe 5)
=====

Diese Tiere dienten vorzugsweise als Gewichtskontrolle gegenüber den übrigen Tiergruppen (s. Abb. 14). Sämtliche Kontrolltiere blieben während der gesamten Versuchsdauer unauffällig.

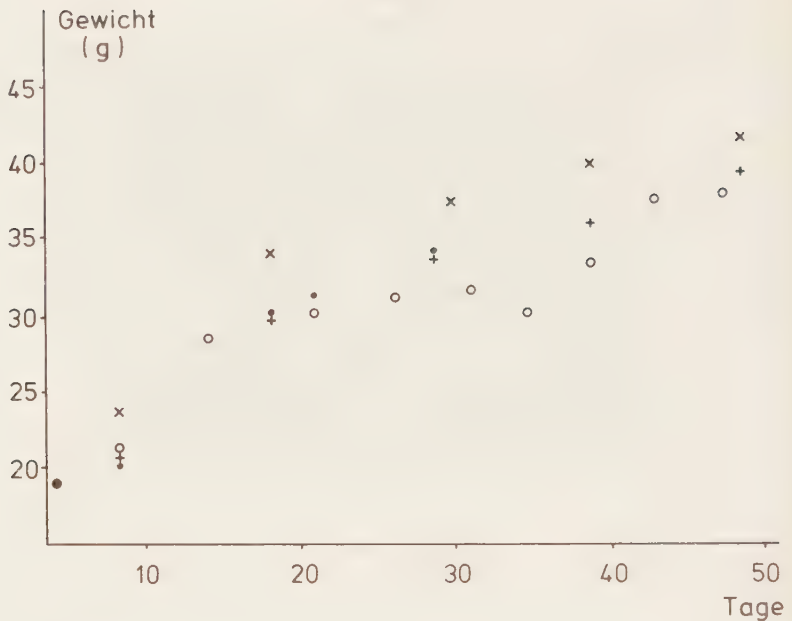


Abbildung 14

Gewichtvergleich von Tieren der Gruppen 2, 3, 4 und 5

- o = Gruppe 2: infizierte und unbehandelte Tiere
- = Gruppe 3: infizierte und ab 1. Tag bis 30. Tag behandelte Tiere
- + = Gruppe 4: infizierte und ab 16. Tag bis 67. Tag behandelte Tiere
- x = Gruppe 5: nicht infizierte und nicht behandelte Kontrolltiere
- = durchschnittliches Gewicht zu Beginn des Versuchs: 17 g/Maus.

D. Das Körpergewicht der Tiere während des Versuchs
=====

Die Gewichtszunahme der Kontrolltiere (Gruppe 5) lag immer über derjenigen der infizierten Tiere.

(s. Abb. 14).

Die Gewichtszunahme der behandelten Tiere (Gruppe 3 und 4) verlief weitgehend parallel zu derjenigen der Kontrolltiere.

Eine kontinuierliche Gewichtszunahme während der Versuchszeit lag bei den unbehandelten Tieren nicht vor. Die auffälligen Gewichtsschwankungen zwischen dem 30. und 35. Tag p.i. deckten sich mit der hohen Mortalitätsrate in diesem Zeitraum.

E. Über die Beurteilung des *Cryptococcoms* im Hinter-
=====
schenkel der Maus in vivo
=====

Es wurde versucht, die makroskopische Veränderung des Hinterschenkels anhand von 4 Schweregraden zu beurteilen. Es schien aber zweckmäßig, die Schweregrade 1 und 2 sowie 3 und 4 jeweils zusammengefaßt einander gegenüberzustellen. Hiermit sollte ein objektiver Vergleich zwischen den kleineren und größeren *Cryptococcomen* gewährleistet sein.

Die vergleichende Untersuchung der Gruppe 2 (unbehandelte Tiere) und Gruppe 4 (ab 16. Tag behandelte Tiere) ergab folgendes:

- a) Bis zum 20. Tag p.i. entwickelten sich die geringeren Verdickungen bei Tieren beider Gruppen identisch. Danach stieg die Häufigkeit der Verdickungen bei spätbehandelten Tieren auf ein Maximum zwischen dem 30. und 40. Tag an und fiel bis zum Ende des Versuchs leicht ab. Sie blieb aber während dieser Zeit immer über der Anzahl der kleineren Umfangsvermehrungen bei unbehandelten Tieren (s. Abb. 15).

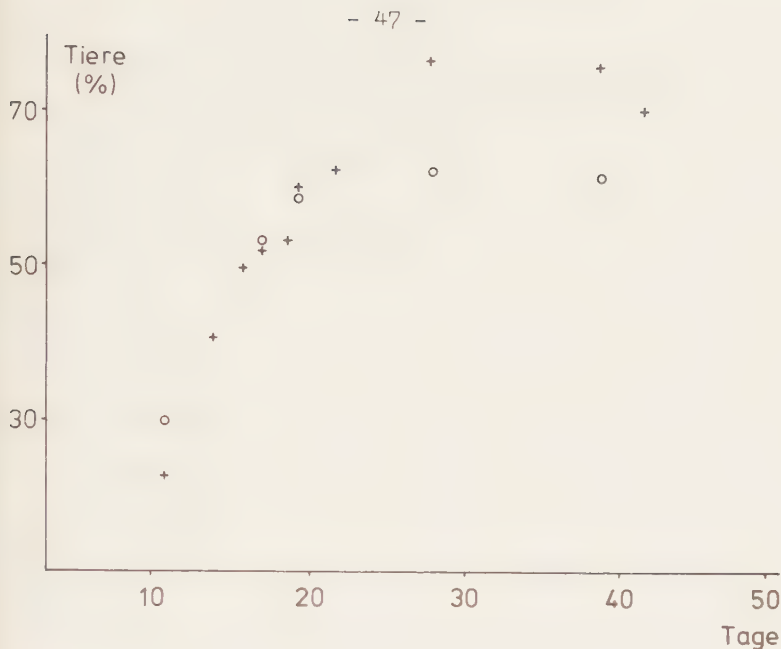


Abbildung 15

Entwicklung der Hinterschenkelverdickung geringerer Größe
bei Tieren der Gruppen 2 und 4

o = Gruppe 2: infizierte und unbehandelte Tiere

+ = Gruppe 4: infizierte und ab 16. Tag bis 67. Tag
behandelte Tiere

Bis ca. 20. Tag fanden sich Umfangsvermehrungen dieser Größe gleich häufig bei Tieren beider Gruppen. In den folgenden Tagen fanden sich Verdickungen dieser Größe häufiger bei Tieren der Gruppe 4. Während der Therapie nahm die Zahl der Tiere mit starker Hinterschenkelverdickung bei dieser Gruppe gleichzeitig kontinuierlich ab.

Vergleiche hierzu auch Abb. 16.

- b) Bei einem Vergleich der stark verdickten Hinterschenkel konnte bei spätbehandelten Tieren ein steiler Anstieg zwischen dem 14. und 20. Tag p.i. beobachtet werden. Ab dem 22. Tag fiel die Anzahl der Tiere mit großen Umfangsvermehrungen am Hinterschenkel kontinuierlich ab.

Bei den unbehandelten Tieren der Gruppe 2 stieg die Zahl der Tiere mit stark verdickten Hinterschenkeln ab dem 15. Tag steil an. Nach 40 Versuchstagen wiesen ca. 40 % der untersuchten Tiere Verdickungen dieser Größe auf (s. Abb. 16).

Tiere, die ab dem 1. Tag p.i. behandelt wurden (Gruppe 3), zeigten keinerlei Veränderungen am infizierten Hinterschenkel.

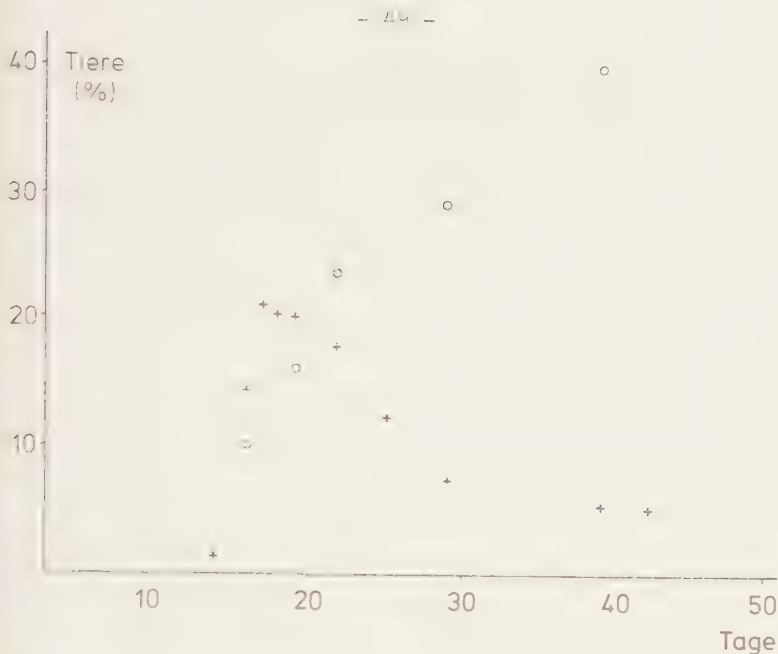


Abbildung 16

Entwicklung der Hinterschenkelverdickung stärkerer Größe bei Tieren der Gruppen 2 und 4

o = Gruppe 2: infizierte und unbehandelte Tiere

+ = Gruppe 4: infizierte und ab 16. Tag bis 67. Tag behandelte Tiere

Die Zahl der Tiere mit stark verdickten Hinterschenkeln stieg bei Tieren der Gruppe 2 kontinuierlich steil an. Bei Tieren der Gruppe 4 nahmen Umfangsvermehrungen dieser Größe bis zum 18. Tag zu. Danach verringerte sich ihre Anzahl bis auf weniger als 5 % bei den untersuchten Tieren.

F. Empfindlichkeitsprüfung gegen Amphotericin B in vitro
=====

Das hier geprüfte Modell zur Untersuchung der Therapierbarkeit des *Cryptococcus* setzte voraus, daß die Wirkung von Amphotericin B während der gesamten Therapiedauer unverändert bestand. Zur Klärung dieser Frage wurde folgende Versuchsanordnung getroffen:

Das Sektionsmaterial von 5 unbehandelten Tieren wurde 44 Tage p.i. auf SABOURAUD-Dextrose-Agar mit mehreren interessierenden Amphotericin B-Konzentrationen zum Erregernachweis und der Feststellung seiner Empfindlichkeit gegen Amphotericin B ausgeimpft. Ebenso wurde mit 5 Tieren verfahren, die über 29 Tage mit Amphotericin B behandelt wurden.

Es wurde festgestellt, daß kein Unterschied in der Empfindlichkeit des geprüften Stammes vor und nach der Therapie gegen Amphotericin B vorlag. Die MHK von Amphotericin B gegen die C. neoformans-Isolate aus den Organen beider Tiergruppen lag bei 1 γ /ml Nährboden (s. Abb. 2a, b und c).

IV. Diskussion

Wie die Ergebnisse zeigen, konnte bei einer Tagesdosis von 1 mg Amphotericin B oral über einen Zeitraum von 30 Tagen verabreicht, nicht nur die Ausbildung eines Cryptococcums am Infektionsort, sondern auch bei über 90 % der Tiere eine Streuung von C. neoformans in parenchymatöse Organe verhindert werden. Schon vorhandene Cryptococcome, einschließlich der Streuherde in parenchymatösen Organen, konnten bei dieser Dosierung und einer Behandlungsdauer von 29 bzw. 52 Tagen in ihrer Weiterentwicklung zwar gehemmt, nicht aber beseitigt werden. In 87 % bzw. 94 % dieser Cryptococcome fanden sich nach der gewählten Therapiedauer noch vermehrungsfähige Zellen von C. neoformans.

Keines der 100 Tiere mit Cryptococcom im Injektionsbereich und Herden in parenchymatösen Organen verendete während der Behandlungsdauer von 29 bzw. 52 Tagen. Von 100 unbehandelten Mäusen lebten am 40. Tag nur noch 30 Tiere (s. Abb. 5). Eindrucksvoll wird hiermit die hemmende Wirkung von Amphotericin B auf die Entstehung und Weiterentwicklung des Cryptococcums einschließlich der Streuherde gezeigt. Daß diese antimyzetische Wirkung von Amphotericin B unter den hier gewählten methodischen Voraussetzungen zwar die Weiterentwicklung eines Cryptococcums verhindern kann, dagegen nicht im gesamten Bereich des Cryptococcums den Erreger erfaßt, macht deutlich, daß bei der Amphotericin B-Therapie der Cryptococcose streng zwischen der anti-

myzetischen und antimykotischen Wirkung zu unterscheiden ist.

Aufgrund dieser Beobachtung verdient das hier zur Diskussion stehende Tierversuchsmodell besondere Beachtung (48). Weil die Cryptococcose bei Mensch und Tier durch die Bildung von Cryptococcomen charakterisiert ist, sollte deshalb auch die antimykotische Wirkung eines Präparates in der Therapierbarkeit derartiger Gewebsveränderungen gesucht werden. Bei den bisher beschriebenen Prüfungen von Antimykotika gegen C. neoformans im Tierexperiment wurden diese Kriterien nicht erhoben. Soweit aus der Literatur bekannt, wurde das Cryptococcom als pathologisch-anatomische Besonderheit der Cryptococcose auf seine Therapierbarkeit im Tierexperiment noch nicht untersucht. Bei dem häufigst geübten Infektionsverfahren im Tierexperiment, der intravenösen Injektion, wie auch von SHADOMY et al. (45) angewandt, kommt es innerhalb kurzer Zeit zu einer unnatürlichen Überschwemmung aller Organe mit dem Erreger. Die hierbei anschließend durchgeführten Therapieversuche lassen auch bei entsprechender Wirkung keine Schlüsse auf die Therapierbarkeit des Cryptococcoms als einer Gewebsveränderung zu.

Auch die übrigen Infektionsverfahren im Tierexperiment (subcutan, intraperitoneal, intracerebral und aerogen) zeigten keinen derartigen Verlauf bei gleichzeitig ver-

folgbarer Cryptococcombildung (2, 5, 23, 30, 45, 46, 58, 61).

Das hier zur Diskussion stehende Modell zeigte bei dem umfangreichen Versuchstierkontingent unter Verwendung desselben Stammes einheitlich reproduzierbare Infektionsabläufe.

Die zu behandelnde Gewebsveränderung durch C. neoformans kommt besonders durch die festgestellten patho-histologischen Gewebsveränderungen zum Ausdruck.

Wie beobachtet, fanden sich nach i.m.-Injektion zwei verschiedenartige Formen der Kolonisation von C. neoformans. Die eine war gekennzeichnet durch ihre reaktionsarme Vermehrungsweise, die andere durch eine Vermehrung der Erreger bei gleichzeitiger Gewebsreaktion. Diese beiden Manifestationsformen des Erregers finden sich auch bei der Cryptococcose des Menschen. Daraus ergibt sich, daß auch zwei Manifestationsformen für die Therapie der Cryptococcose zur Diskussion stehen. Größere Bedeutung kommt der reaktionsarmen Form, auch gelatinöse genannt, aus klinisch-pathogenetischer und therapeutischer Sicht zu. Als Ursache der reaktionsarmen Form gilt die starke Bekapselung der C. neoformans-Zelle in vivo (32, 56).

Deshalb verdient die Kapselbildung und ihre Beeinflussung durch therapeutische Maßnahmen besondere Beachtung (22),

was auch bei vorliegenden Untersuchungen eindrucksvoll belegt werden konnte.

Bei der Untersuchung des Infektionsortes zeigten sich zunächst Haufen der unbekapselt inokulierten Erregerzellen. Innerhalb der folgenden Tage kam es dann zu ihrer zunehmenden Bekapselung bei gleichzeitiger Druckatrophie der Muskelfasersubstanz. Bei den ab dem Tag der Injektion behandelten Tieren fanden sich noch nach 30 Tagen zwischen unveränderten Muskelfasern kleine Gruppen unbekapselter und noch nicht phagozytierter Zellen (s. Abb. 10).

Da aus diesen Infektionsorten, die aufgrund der Amphoterizin B-Therapie unauffällig blieben, vermehrungsfähiger C. neoformans isoliert werden konnte, kann die fehlende Kapselbildung auf die Amphoterizin B-Wirkung zurückgeführt werden. Darüber hinaus kommt hierbei aber gleichzeitig zum Ausdruck, daß die Kapsel, wie früher vermutet, allein nicht verantwortlich sein kann für die Verhinderung der Phagozytose. Zweifellos muß die Kapsel als Teil der pathogenen Zustandsform von C. neoformans im Gewebe gesehen werden, da bisher bei jeder Cryptococcose von Mensch und Tier vorwiegend bekapselte Zellen in den befallenen Organen nachgewiesen wurden (38).

Daß die Kapselbildung bei C. neoformans im Gewebe durch Amphotericin B verhindert oder gestört wird, konnte besonders bei der Therapie der 15 Tage alten Cryptococcome nachgewiesen werden. Hierbei zeigten die einzelnen, wie auch die im Verband liegenden bekapselten Zellen nach Amphotericin B-Therapie Veränderungen in Form und Anfärbbarkeit; Zellverbände waren zu dichtgepackten Haufen überwiegend kapselloser oder gering bekapselter Cryptokokken zusammengeschrumpft (s. Abb. 17).

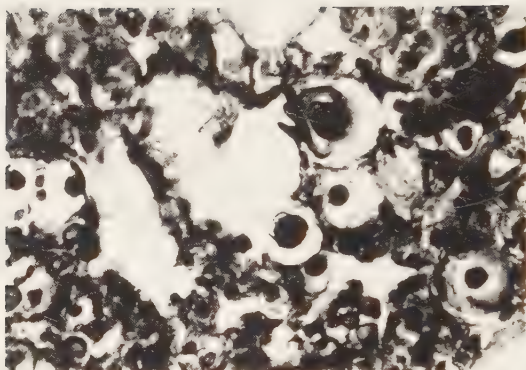


Abbildung 17

Streuung von C. neoformans in der Lunge 67 Tage nach
i.m.-Injektion bei einem Tier der Gruppe 4

Beginn der Therapie am 16. Tag p.i.

Degenerationsformen teils gruppiert, teils einzeln liegender Pilzzellen. Fehlen der Kapsel, Kapselschrumpfung, Zerbrechen der Zellwand und Veränderung der Anfärbbarkeit.

(PAS; x 560 Öl)

Da auffälligerweise perivaskulär ein verstärkter Kapselmangel beim Erreger im Cryptococcom zu beobachten war (s. Abb. 12), kommt der Vaskularisation dieser Gewebsveränderungen auch in therapeutischer Sicht entsprechende Bedeutung zu, was auch durch die Verminderung von Streuherden nach sofort eingeleiteter Therapie festgestellt werden konnte.

Aus dem zwangsläufigen Nebeneinander beider Kolonisationsformen, d.h. gelatinöser und reaktiver Herde mit Granulationsgewebswällen sind Manifestationen vorstellbar, die wirksame Gewebsspiegel von Amphotericin B auf kleinstem Raum verhindern können (s. Abb. 13). Nur so ist es erklärbar, daß trotz Verhinderung des tödlichen Infektionsablaufs durch Amphotericin B noch nach 52-tägiger Behandlungsdauer der Erreger aus bestimmten Herden isoliert werden konnte. Von Bedeutung war hierbei, daß diese Isolate noch über dieselbe Empfindlichkeit gegen Amphotericin B verfügten wie vor dem Therapieversuch. Diese Feststellung ist deshalb von Bedeutung, da es BODENHOFF in vitro gelungen ist, bei einem C. neoformans-Stamm, der über längere Zeit auf einem Amphotericin B-haltigen Nährboden gezüchtet wurde, eine entsprechende Unempfindlichkeit gegen dieses Antimykotikum zu erzeugen (6, 7).

Aus diesen Feststellungen geht deutlich hervor, daß nur genügend lang wirksame Amphotericin B-Spiegel eine Ausheilung gewährleisten und Rezidive, wie sie in vorliegender Arbeit nach frühzeitiger Beendigung der Therapie ausgelöst wurden, verhindern können.

Eine Therapiedauer von 28 Tagen, wie sie für die i.v.-infizierten Tiere nach SHADOMY et al. (45) ausreichend war, wäre nach unseren Beobachtungen für die Ausheilung eines 15 Tage alten Cryptococcums nicht genügend.

Damit wurde unsere eingangs gestellte Frage, wieweit unter derselben Amphotericin B-Therapie, wie von SHADOMY durchgeführt, das Cryptococcom beeinflußt werden kann, beantwortet.

Das von uns verwendete Tierversuchsmodell einschließlich der zeitlichen Verfolgung des Infektionsablaufs und der Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials belegte, welche Bedeutung auch den patho-histologischen Besonderheiten dieser Mykose bei der Wirksamkeitsprüfung eines Antimykotikums zukommt.

Vergleichende mikrobiologische und patho-histologische Befunde bei der Cryptococcose waren bis zur Einführung eines Differentialnährbodens für C. neoformans sehr erschwert. Bei vorliegenden Untersuchungen konnte mit Hilfe von

Guizotia abyssinica-Kreatinin-Agar (54) jede Verunreinigung durch andere Pilze ausgeschlossen werden. Soweit aus der Literatur zu ersehen, wurde bei entsprechenden Versuchen von einer solchen Maßnahme nicht Gebrauch gemacht.

Da bei Versuchstieren die verschiedensten Verunreinigungsmöglichkeiten besonders bei der Sektion und Aufarbeitung der Organmaterialien gegeben sind, sollte auch bei der Arbeit mit dieser Keimgruppe von solchen Kontrollmaßnahmen Gebrauch gemacht werden.

Abschließend sei darauf aufmerksam gemacht, daß sich die erhobenen Befunde nur auf e i n e n Stamm von C. neoformans beziehen. Dieser Stamm, aus Vogelkot isoliert, zeigte bisher dieselben Eigenschaften in der Kultur und im Tierexperiment wie Stämme von tödlich verlaufenden Cryptococcose-Erkrankungen beim Menschen (51, 54).

V. Zusammenfassung

1. Für vorliegende Untersuchung diente der Stamm C. neoformans W 71 (1961 aus Kanarienvogelkot isoliert). Er besitzt die Fähigkeit zur Cryptococcombildung und zeigt dieselben Eigenschaften in der Kultur und im Tierexperiment wie Stämme von tödlich verlaufenden Cryptococcose-Erkrankungen bei Menschen. Für vergleichende tierexperimentelle Untersuchungen erwies sich die i.m.-Injektion mit anschließender Cryptococcombildung als günstig, weil reproduzierbare Veränderungen am Injektionsort bei einem großen Tierkontingent erreicht werden konnten.
2. 400 weißen männlichen NMRI-Mäusen wurde intramuskulär eine Aufschwemmung von C. neoformans injiziert (0,2 ml; Keimdichte: $2,8 \times 10^7/\text{ml}$). 100 Tiere, die nicht infiziert und nicht behandelt wurden, dienten als Kontrolle. Amphotericin B wurde in einer Dosis von 1 mg/Maus täglich mit Hilfe einer Magensonde verabreicht.
3. Bei einer ab dem Tag der Infektion einsetzenden Therapie über einen Zeitraum von 30 Tagen konnte sowohl die Ausbildung eines Cryptococcoms am Injektionsort, als auch eine Streuung von C. neoformans in parenchymatöse Organe zu über 90 % verhindert werden.

Bei spät einsetzender Therapie schon vorhandener Cryptococcome sowie der Streuung des Erregers in innere Organe ließ sich vermehrungsfähiger C. neoformans nach 52-tägiger Therapie zu ca. 90 % aus dem Injektionsort und zu ca. 55 % aus parenchymatösen Organen nachweisen.

4. Während der Behandlungszeit starb kein Tier von denen, die ab dem Tag der Injektion behandelt wurden. Bei der Tiergruppe mit spät einsetzendem Therapiebeginn verendeten bis zum 15. Tag 6 Tiere. Während der anschließenden Therapiedauer über 52 Tage verstarb kein weiteres Tier. Von 100 infizierten, aber unbehandelten Tieren verendeten bis zum 30. Tag 50 und bis zum 40. Tag 70 Tiere.
5. Patho-histologisch zeigte sich, daß die unbekapselt inoculierte C. neoformans-Zelle bei sofort beginnender Therapie an ihrer Kapselbildung gehindert werden konnte. Es fand sich nur eine geringe Gewebsreaktion. Bei Tieren mit spät einsetzender Therapie und bereits vorhandenem Cryptococcom fand sich Kapselmangel und z.T. geringe Rundzellinfiltration besonders in der Gefäßumgebung. Daneben traten ausgedehnte Reaktionserscheinungen mit unspezifischem, fibrohistiocytären Granulationsgewebe auf. Die Cryptococcome waren zusammengeschrumpft und enthielten dichtliegende Erregermassen. Die einzeln liegende C. neoformans-Zelle zeigte unter der Amphoterin B-Therapie Kapselschrumpfung, Fehlen der Kapsel,

Zerbrechen der Zellwand und Veränderung der Anfärbbarkeit. Bei infizierten und unbehandelten Tieren nahm die Vermehrung bekapselter C. neoformans-Zellen ständig zu. Die entzündliche Reaktion im Injektionsort blieb gering. In parenchymatösen Organen fand sich ebenfalls eine nur geringe Reaktion in ausgedehnten Infiltraten oder kleinen Streuherden mit bekapselten Pilzzellen.

6. Zusammenfassend wurde festgestellt, daß das Cryptococcom als pathologisch-anatomisches Charakteristikum der Cryptococcose des Menschen im Tierversuchsmodell erreichbar ist und sich somit zur Prüfung der Wirksamkeit von interessierenden Antimykotika im Tierversuch in besonderem Maße anbietet. Gleichzeitig ist hierbei die Möglichkeit zum Studium mikrobiologischer und pathologischer Zusammenhänge dieser Mykose im Hinblick auf ihre Therapierbarkeit gegeben.

VI. Literaturverzeichnis

1. ALLCOCK, E.A.: TORULOSIS.
J.Bone Jt Surg. 43, 71-76 (1961)
2. ATA, S. und STAIB, F.: EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR
THERAPIE DER TORULOSE.
Arzneimittel-Forsch. 8, 159-160
(1958)
3. BARTMANN, K.: ANTIMIKROBIELLE CHEMOTHERAPIE.
Springer, Berlin-Heidelberg-New
York, 154-158 (1974)
4. BELL, N.H., ANDRIOLE, V.T.,
SABESIN, S.M. and UTZ, J.P.: ON THE NEPHROTOXICITY OF AMPHOTE-
RICIN B IN MAN.
Amer.J.Med. 32, 64-69 (1962)
5. BERGMAN, F.: PATHOLOGY OF EXPERIMENTAL CRYPTO-
COCCOSIS. A STUDY OF COURSE AND
TISSUE RESPONSE IN SUBCUTANEOUSLY
INDUCED INFECTION IN MICE.
Acta path.microbiol.scand. 73,
1-163 (1961)
6. BODENHOFF, J.: ALTERATION IN VIRULENCE IN STRAINS
OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS RESI-
STANT TO AMPHOTERICIN B AND POLY-
MYXIN B.
Acta path.microbiol.scand. 75,
153-168 (1969)
7. BODENHOFF, J.: DEVELOPMENT OF STRAINS OF CRYPTO-
COCCUS NEOFORMANS RESISTANT TO
NYSTATIN, AMPHOTERICIN B, TRICHO-
MYCIN AND POLYMYXIN B.
Acta path.microbiol. scand. 73,
572-582 (1968)
8. BRANDRISS, M.W., WOLFF, S.M.,
MOORES, R. and STOHLMAN, F.jr.: ANEMIA INDUCED BY AMPHOTERICIN B.
J.Amer.med.Ass. 189, 663-666 (1964)
9. BUSSE, O.: ÜBER PARASITÄRE ZELLEINSCHLÜSSE
UND IHRE ZÜCHTUNG.
Zbl.Bakt., I.Abt.Orig. 16, 175-180
(1894)
10. BUSSE, O.: DIE HEFEN ALS KRANKHEITSERREGER.
Hirschwald, Berlin (1897)

11. BUTLER, W.T.,
BENNETT, J.E.,
ALLING, D.W.,
WERTLAKE, P.T.,
UTZ, J.P. and
HILL, G.J.:
NEPHROTOXICITY OF AMPHOTERICIN B.
EARLY AND LATE EFFECTS IN 81 PA-
TIENTS.
Ann.intern.Med. 61, 175-187 (1964)
12. CAMPBELL, C.C. and
HILL, G.B.:
BENEFICIAL THERAPEUTIC EFFECTS OF
SOLUBILIZED AMPHOTERICIN B AFTER
ORAL ADMINISTRATION IN EXPERIMEN-
TAL COCCIDIOIDOMYCOSIS, HISTO-
PLASMOSIS, AND CRYPTOCOCCOSIS IN
MICE.
Antibiot. Ann. 622-630 (1959-1960)
13. CARNECCHIA, B.M. and
KURTZKE, J.F.:
FATAL TOXIC REACTION TO AMPHOTE-
RICIN B IN CRYPTOCOCCAL MENINGO-
ENCEPHALITIS.
Ann.intern.Med. 53, 1027-1036
(1960)
14. COLLINS, V.P.:
BONE INVOLVEMENT IN CRYPTOCOCCO-
SIS (TORULOSIS).
Amer.J.Roentgenol. 63, 102-112
(1950)
15. COLMERS, R.A.,
IRNIGER, W. and
STEINBERG, D.H.:
CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS. ENDOCAR-
DITIS CURED BY AMPHOTERICIN B.
J.Amer.med.Ass. 199, 762-764
(1967)
16. DROUHET, E. et
MARTIN, L.:
CRYPTOCOCCOSE, CUTANÉE ET OSSEUSE
CHEZ UNE DIABÉTIQUE ÂGÉE. TRAITE-
MENT PAR L'AMPHOTERICINE B.
Bull.Soc.franc.Derm.Syph. 69,
25-29 (1962)
17. DURANT, J.R.,
EPIFANO, L.D. and
EYER, S.W.:
PULMONARY CRYPTOCOCCOSIS: TREAT-
MENT WITH AMPHOTERICIN B.
Ann.intern.Med. 53, 534-547 (1960)
18. DURIE, E.B. and
MACDONALD, L.:
CRYPTOCOCCOSIS (TORULOSIS) OF
BONE. REPORT OF A CASE.
J.Bone Jt Surg. 43, 68-70 (1961)
19. EMMONS, C.W.,
BINFORD, C.H. and
UTZ, J.P.:
MEDICAL MYCOLOGY.
Lea & Febiger, Philadelphia (1970)
20. GERACI, J.E.,
DONOGHUE, F.E. and
ELLIS, F.H., JR.:
FOCAL PULMONARY CRYPTOCOCCOSIS.
EVALUATION OF NECESSITY OF AMPHO-
TERICIN B THERAPY.
Proc.Mayo Clin. 40, 552-559 (1965)

21. GOLD, W.,
STOUT, H. A.,
PAGANO, J. F. and
DONOVICK, R.: AMPHOTERICINS A AND B; ANTIFUNGAL
ANTIBIOTICS PRODUCED BY A STREPTO-
MYCETE. I. IN VITRO STUDIES.
Antibiot. Ann. 1955-1956, Med. Ency-
clopedia, Inc., New York 579
(1956)
22. GORDON, M. A. and
LAPA, E.: SYNERGISTIC ACTION OF IMMUNE GLO-
BULIN WITH AMPHOTERICIN B IN
CRYPTOCOCCOSIS.
Ann. Rep. Div. Lab. Res. Albany, 70-80
(1961)
23. HASENCLEVER, H. F. and
MITCHELL, W. O.: VIRULENCE AND GROWTH RATES OF
CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS IN MICE.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 85, 156-162
(1960)
24. HAUGEN, R. K. and
BAKER, R. D.: THE PULMONARY LESIONS IN CRYPTO-
COCCOSIS WITH SPECIAL REFERENCE
TO SUBPLEURAL NODULES.
Am. J. Clin. Path. 24, 1381-1390
(1954)
25. HICKIE, J. B. and
WALKER, Th.: CRYPTOCOCCOSIS (TORULOSIS): SOME
PROBLEMS IN DIAGNOSIS AND MANAGE-
MENT.
Aust. Ann. Med. 13, 229-239 (1964)
26. JESSE, C. H.: CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS INFECTION
(TORULOSIS) OF BONE. REPORT OF A
CASE.
J. Bone Jt Surg. 29, 810-811 (1947)
27. KRESS, M. B. and
CANTRELL, J. R.: PULMONARY AND MENINGEAL CRYPTO-
COCCOSIS. SUCCESSFUL TREATMENT OF THE
MENINGITIS WITH LATERAL CEREBRAL
INTRAVENTRICULAR INJECTION OF
AMPHOTERICIN B.
Arch. intern. Med. 112, 386-392
(1963)
28. LEOPOLD, S. S.: PULMONARY MONILIASIS AND CRYPTO-
COCCAL OSTEOMYELITIS IN THE SAME
PATIENT.
Med. Clin. N. Amer. 37, 1737-1746
(1953)
29. LODDER, J. and
KREGER-VAN RIJ, N. J. W.: THE YEASTS.
North Holland Publ. Comp.,
Amsterdam (1967)

30. MAHNKE, P.-E.: EXPERIMENTELLE CRYPTOCOCCOSE DER MAUS.
Zbl.Allg.Path.Anat. 103, 447-454 (1962)
31. MARTIN, W.J.,
NICHOLS, D.R.,
SVIEN, H.J. and
ULRICH, J.A.: CRYPTOCOCCOSIS. FURTHER OBSERVATIONS AND EXPERIENCE WITH AMPHOTERICIN B.
Arch.intern.Med. 104, 4-15 (1959)
32. MITCHELL, T.G. and
FRIEDMAN, L.: IN VITRO PHAGOCYTOSIS AND INTRACELLULAR FATE OF VARIOUSLY ENCAPSULATED STRAINS OF CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS.
Infect.Immun. 4, 491-498 (1972)
33. MORRIS, E. and
WOLINSKY, E.: LOCALIZED OSSEOUS CRYPTOCOCCOSIS.
J.Bone Jt Surg. 47, 1027-1029 (1965)
34. NEWCOMER, V.D.,
STERNBERG, T.H.,
WRIGHT, E.T.,
REISNER, R.M.,
McNALL, E.G. and
SÖRENSEN, L.J.: THE TREATMENT OF SYSTEMIC FUNGUS INFECTIONS WITH AMPHOTERICIN B.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 89, 221-239 (1960)
35. OSSWALD, H. und
SEELIGER, H.P.R.: TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN MIT ANTIMYKOTISCHEN MITTELN.
Z.Immun.-Forsch. 119, 100-114 (1960)
36. PRICE, J.T. and
BULMER, G.S.: TUMOR INDUCTION BY CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS.
Infect.Immun. 6, 199-205 (1972)
37. RUBIN, H.,
LEHAN, P.H.,
FITZPATRICK, M.J. and
FURCOLOW, M.L.: AMPHOTERICIN B IN THE TREATMENT OF CRYPTOCOCCAL MENINGITIS.
Antibiot.Ann. 71-74 (1957-1958)
38. SALFELDER, K.: CRYPTOCOCCOSIS. In: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie. II. Band, 5. Teil: THE PATHOLOGIC ANATOMY OF MYCOSES. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 383-464 (1971)
39. SANFELICE, F.: SULL'AZIONE PATOGENA DEI BLASTOMICETI.
Ann.Igiene, (sperimentale) V, 239-262 (1895)

40. SAROSI, G.A.,
PARKER, J.D.,
DOTO, I.L. and
TOSH, F.E.:
AMPHOTERICIN B IN CRYPTOCOCCAL
MENINGITIS.
Ann.intern.Med. 71, 1079-1087
(1969)
41. SEELIGER, H.P.R. und
STAIB, F.:
KLINISCH-EPIDEMIOLOGISCHE PROBLEME
DER CRYPTOCOCCOSE.
Fortschr.Med. 84, 436-440 (1966)
42. SEELIGER, H.P.R. und
WERNER, H.:
ERZEUGUNG VON KRANKHEITZUSTÄNDEN
DURCH SPROBPILZE UND SCHIMMELPIL-
ZE. In: Handbuch der experimentel-
len Pharmakologie, Band XVI/11 A.
Springer, Berlin-Heidelberg-New
York (1967)
43. SHADOMY, S.,
SHADOMY, H.J.,
McCAY, J.A. and
UTZ, J.P.:
IN VITRO SUSCEPTIBILITY OF CRYPTOCOC-
CUS NEOFORMANS TO AMPHOTERICIN B,
HAMYCIN AND 5-FLUOROCYTOSINE.
Antimicrob.Agents Chemother.
452-460 (1968)
44. SHADOMY, S.,
McCAY, J.A. and
SCHWARTZ, St.I.:
BIOASSAY FOR HAMYCIN AND AMPHOTE-
RICIN B IN SERUM AND OTHER BIOLO-
GICAL FLUIDS.
Appl.Microbiol. 4, 497-503 (1969)
45. SHADOMY, S.,
SHADOMY, H.J. and
UTZ, J.P.:
IN VIVO SUSCEPTIBILITY OF CRYPTO-
COCUS NEOFORMANS TO HAMYCIN,
AMPHOTERICIN B AND 5-FLUOROCYTOSINE.
Infect.Immun. 1, 128-134 (1970)
46. SMITH, C.D.,
RITTER, R.,
LARSH, H.W. and
FURCOLOW, M.L.:
INFECTION OF WHITE SWISS MICE WITH
AIRBORNE CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS.
J.Bact. 87, 1364-1368 (1964)
47. STAIB, F.:
VORKOMMEN VON CRYPTOCOCCUS NEOFOR-
MANS IM VOGELMIST.
Zbl.Bakt., I.Abt.Orig. 182,
562-563 (1961)
48. STAIB, F.:
CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS IM MUSKEL-
GEWEBE.
Zbl.Bakt., I.Abt.Orig. 185,
135-144 (1962)
49. STAIB, F.:
VOGELKOT, EIN NÄHRSUBSTRAT FÜR
DIE GATTUNG CRYPTOCOCCUS.
Zbl.Bakt., I.Abt.Orig. 186,
233-247 (1962)

50. STAIB, F.: EPIDEMIOLOGY OF CRYPTOCOCCOSIS.
Comptes rendus du 1^{er} Multicol-
loque européen de Parasitologie,
Rennes (France) (1971)
51. STAIB, F., und
MISHRA, S. K.: ZUR STAMMSPEZIFISCHEN VIRULENZ VON
CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS. TIEREXPE-
RIMENTELLE BEOBACHTUNGEN ÜBER ZWEI
C. NEOFORMANS-STÄMME AUS VOGELFÄ-
KALIEN.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 250,
81-85 (1975)
52. STAIB, F.,
RANDHAWA, H. S. and
BLISSE, A.: OBSERVATIONS ON EXPERIMENTAL SPO-
ROTRICHOSIS OF THE MUSCLE.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 221,
250-256 (1972)
53. STAIB, F. und
SENSKA, M.: DER BRAUNFARBEFFEKT (BFE) BEI
CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS AUF GUIZO-
TIA ABYSSINICA-KREATININ-AGAR IN
ABHÄNGIGKEIT VOM AUSGANGS-PH-WERT.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 265,
113-124 (1973)
54. STAIB, F.,
RANDHAWA, H. S.,
GROSSE, G. und
BLISSE, A.: CRYPTOCOCCOSE. ZUR IDENTIFIZIE-
RUNG VON CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS
AUS KLINISCHEM UNTERSUCHUNGSMAT-
TERIAL.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 225,
211-222 (1973)
55. STEIN, J. M. and
BURTON, P. J.: CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS INFECTION
OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM:
A CASE TREATED BY AMPHOTERICIN B
WITH POSTMORTEM EXAMINATION.
Ann. intern. Med. 52, 445-453 (1960)
56. TACKER, J. R.,
FARHI, F. and
BULMER, G. S.: INTRACELLULAR FATE OF CRYPTOCOC-
CUS NEOFORMANS.
Infect. Immun. 6, 162-167 (1972)
57. TÜMBAY, E. and
SEELIGER, H. P. R.: OBSERVATIONS IN THE LABORATORY
DIAGNOSIS OF CRYPTOCOCCUS NEOFOR-
MANS - (OBSERVATION OF 11 CASES).
Castellania 2, 4-6 (1974)
58. UTZ, J. P. and
ANDRIOLE, V. T.: ANALYSIS OF AMPHOTERICIN B TREAT-
MENT FAILURES IN THE SYSTEMIC
FUNGAL DISEASES.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 69, 445-453
(1960)

59. UTZ, J.P.,
BENNETT, J.E.,
BRANDRISS, M.W.,
BUTLER, W.T. and
HILL, G.J.:
AMPHOTERICIN B TOXICITY. COMBINED
CLINICAL STAFF CONFERENCE AT THE
NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH.
Ann.intern.Med. 61, 334-354 (1964)
60. UTZ, J.P. and
BUTLER, W.T.:
CRYPTOCOCCUS-MENINGITIS. NEUERE
BEOBACHTUNGEN ZUR ERKENNUNG UND
THERAPIE.
Dtsch.med.Wschr. 90, 941-943 (1965)
61. VANBREUSEGHEM, R.:
WHITE MICE SENSITIVITY TO CRYPTO-
COCCUS NEOFORMANS PRODUCTION OF
RESISTANCE AGAINST A CEREBRAL
INOCULATION.
Ann.Soc.belge Méd.trop. 47,
281-294 (1967)
62. WALTER, A.M. und
HEILMEYER, L.:
ANTIBIOTIKA-FIBEL.
Georg Thieme, Stuttgart, 3.Auflage,
461-467 (1969)
63. WATANABE, K.,
IKEMOTO, H. and
SHIOKAWA, Y.:
CRYPTOCOCCAL MENINGITIS: A REPORT
OF A SUCCESSFULLY TREATED CASE AND
REVIEW OF THE JAPANESE LITERATURE
BETWEEN 1961 and 1971.
Abstracts Second International
Specialized Symposium on Yeasts,
Tokyo/Japan (1972)
64. WIEBECKE, B. und
STAIB, F.:
GENERALISIERTE CRYPTOCOCCOSE.
Minch.med.Wschr. 107, 361-365
(1965)
65. WIENER, M.F.:
GENERALIZED TORULOSIS WITH BONE
INVOLVEMENT.
Arch.intern.Med. 87, 713-726 (1951)
66. WOLFE, J.N. and
JACOBSON, G.:
ROENTGEN MANIFESTATIONS OF TORU-
LOSIS (CRYPTOCOCCOSIS).
Amer.J.Roentgenol. 79, 216-227
(1958)

Herrn Professor Dr.med.,Dr.med.vet. F. S t a i b
danken wir herzlich für die Überlassung des Themas
und für seinen unermüdlichen Rat bei der Durch-
führung der Dissertation.

Herrn Dr.med. G. G r o s s e danken wir besonders
für seine freundliche Beratung in katholisch-
historischen Fragen zur Dissertation.

Besonderer Dank gilt der Firma Chemische Fabrik
von Heyden GmbH., München, für die freundliche
Überlassung von Amphotericin B.

Lebenslauf

Wolfgang Preuß

geb. am 19.6.1947 in Berlin

Eltern: Gerhard und Dr.med. Gabriele Preuß,

geb. Patzer

1954 - 1958 Grundschule in Berlin-Neukölln

1958 - 1968 Goethe-Gymnasium in Berlin-Wilmersdorf

1968 Abitur

1968 - 1975 Medizinstudium an der Freien Universität Berlin

1975 Medizinisches Staatsexamen in Berlin

Lebenslauf

Erhard Radlmeier

geb. am 18.3.1947 in Landshut

Eltern: Georg und Anna Radlmeier, geb. Dankes-
reiter

1953 - 1957 St.Nikola Volksschule in Landshut

1957 - 1963 Oberrealschule in Landshut

1963 - 1968 Joseph Hofmiller-Gymnasium in Freising

1968 Abitur

1968 - 1975 Medizinstudium an der Freien Universi-
tät Berlin

1975 Medizinisches Staatsexamen in Berlin

